

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 15/24, A61K 37/02 C07K 13/00, C12P 21/02</p>		A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/10235 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Mai 1993 (27.05.93)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02614</p>		<p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(22) Internationales Anmeldedatum: 13. November 1992 (13.11.92)</p>			
<p>(30) Prioritätsdaten: P 41 37 333.2 13. November 1991 (13.11.91) DE</p>			
<p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: SEBALD, Walter [DE/DE]; Meyer-Olberslebenstr. 7, D-8700 Würzburg (DE).</p>			
<p>(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw. ; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).</p>			
<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CS, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).</p>			
<p>(54) Title: HUMAN IL-4 MUTANT PROTEINS</p>			
<p>(54) Bezeichnung: MENSCHLICHE IL-4 MUTANTENPROTEINE</p>			
<p>(57) Abstract</p> <p>Therapeutic agents constituted by or containing antagonists or partial antagonists of human interleukin-4, hIL-4 mutant proteins and a process for producing the same are disclosed.</p>			
<p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft therapeutische Mittel, die Antagonisten oder partielle Antagonisten des humanen Interleukin 4 sind oder diese enthalten, hIL-4-Mutantenproteine sowie Verfahren zu deren Herstellung.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfhögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	CN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	MC	Moskvo	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolci	VN	Vietnam
FI	Finnland				

MENSCHLICHE IL-4 MUTANTENPROTEINE

Breite Bevölkerungsschichten leiden heute an Allergien. Die zunehmende Luftverschmutzung und die zunehmende Zahl an diffus in der Umwelt vorhandenen, allergieauslösenden Substanzen läßt erwarten, daß die Zahl der Erkrankungen, insbesondere bei Kindern, in Zukunft noch weiter steigen wird. Deshalb ist es dringend notwendig, Medikamente zu entwickeln, die in den Ablauf allergischer Prozesse eingreifen können.

Humanes Interleukin-4 (hIL-4) ist eines unter den zahlreichen Cytokinen, die die Proliferation, die Reifung, das Überleben und die Differenzierung lymphoider und myeloischer Zellen induzieren und koordinieren (1-3). Insbesondere ist hIL-4 an der IgE-medierten Immunreaktion beteiligt und beschleunigt direkt die Proliferation von Thymozyten und aktivierten T-Zellen. Man konnte ein hochaffines IL-4-Rezeptorprotein mit Mr 140 000 identifizieren, welches gemäß seiner cDNA-Sequenz aus 800 Aminosäureresten besteht (4). Dieses gehört zu einer kürzlich beschriebenen Gruppe von Rezeptoren, die man als Hämatopoietin-Rezeptor-Superfamilie bezeichnet (5).

Die Aminosäuresequenz des reifen IL-4 besteht aus 129 Resten, wenn man die klonierte cDNA (6) zugrundelegt. Die cDNA ist in E. coli (7, 8) und Hefe (9) exprimiert worden. Aus diesen Quellen kann rekombinantes IL-4 mit hoher biologischer Aktivität gewonnen werden.

Die Rolle des Interleukin 4 bei allergischen Prozessen läßt hoffen, daß Substanzen, die Interleukin-4-vermittelte Prozesse inhibieren oder mit dem hIL-4 konkurrieren, die krankheitsauslösende Reaktionskette unterbrechen.

Es ist deshalb Aufgabe der Erfindung, therapeutische Mittel zur Verfügung zu stellen, deren aktive Bestandteile Antagonisten oder partielle Agonisten des menschlichen Interleukins 4 sind.

In jüngster Zeit ist bereits ein monoklonaler Antikörper bekannt geworden, der gegenüber dem menschlichen Interleukin-4 antagonistische Eigenschaften aufweist (10). Dieser Antikörper enthält ein Fab-Fragment und wird von einer Mensch-Mensch-Hybridomazelllinie produziert. Auch eine Hybridomazelllinie aus Milzzellen einer gegen (nicht-)glycosyliertes menschliches IL-4 immunisierten Ratte produziert monoklonale Antikörpergen hIL-4 (11).

Die gestellte Aufgabe wurde vorliegend erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß therapeutische Mittel bereitgestellt werden, die Antagonisten oder partielle Agonisten des hIL-4 sind oder diese enthalten und dadurch gekennzeichnet sind, daß die Antagonisten oder partiellen Agonisten hIL-4-Mutantenproteine sind. Die Wahl der erfindungsgemäß therapeutischen Mittel hat den Vorteil, daß durch "genetic engineering" gezielt Proteine hergestellt werden können, die durch ihre Ähnlichkeit mit dem Wildtyp hIL-4 mit diesem in Konkurrenz bei der Besetzung des hIL-4-Rezeptors treten.

Es ist weiterhin Aufgabe der Erfindung, hIL-4-Mutantenproteine sowie Verfahren zur deren Herstellung bereitzustellen.

hIL-4 läßt sich als rekombinates Protein (rhIL-4) gentechnologisch, z. B. in E. coli, erzeugen. Das dabei gebildete Protein läßt sich solubilisieren, renaturieren und isolieren. Das rHIL-4 besitzt dann eine hohe spezifische biologische Aktivität, die z. B. durch Messung der DNA-Synthese/Proliferation von aktivierten

T-Zellen oder der CD23 Expression von aktivierten B-Zellen bestimmt werden kann (siehe z. B. Kruse, N. et al. (1991) FEBS Lett. 286, 58-60; Kikutani, H. et al. (1986) Cell 47, 657-665).

Erfnungsgemäß wurde nun ein Verfahren konzipiert, mit dem sich Mutantenproteine des hIL-4-Wildtyps produzieren lassen, welche die Eigenschaften von hIL-4 Antagonisten oder partiellen hIL-4 Agonisten besitzen. Besonders die Antagonisten des hIL-4 bieten die Möglichkeit, spezifisch die Wirkung des hIL-4 zu hemmen. Dazu wird

- cDNA, die einen DNA-Bereich umfaßt, der den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, einer gezielten Oligonucleotid-Mutagenese (site-directed mutagenesis) derart unterworfen, daß an der oder den gewünschten Position(en) eine ausgewählte andere der möglichen natürlichen Aminosäuren exprimiert wird, oder durch ein Stop-Kodon ein Abbruch der Polypeptidkette erzeugt wird,
- der DNA-Bereich, der den mutierten maturen Bereich von hIL-4 kodiert, in einen Expressionsvektor integriert,
- der gebildete Hybrid-Vektor in E. coli eingesetzt und
- das hIL-4-Mutantenprotein exprimiert und gegebenenfalls isoliert.

Zur Beschaffung von cDNA, die einen DNA-Bereich umfaßt, der den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, oder die den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, wird auf (6) und die dort angeführte Literatur verwiesen. Im vorliegenden Zusammenhang werden unter "cDNA, die den maturen Bereich von hIL-4 kodiert" auch cDNAs verstanden, die bei etwa gleicher Anzahl von Basenpaaren Mutanten der konkret im genannten Stand der Technik angegebenen cDNA darstellen, sofern die damit vorzusehenden hIL-4-Mutante ebenfalls Antagonisten oder partielle Agonisten sind.

Hinsichtlich der Durchnumerierung des den maturen Bereich von hIL-4 kodierenden DNA-Bereichs wird hier Garr, C. et al. (Biochemistry (1991) 30, 1515-1523) gefolgt.

cDNA, die den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, kann durch das Ausschneiden eines EcoRV/BamHI-Fragment aus einer gentechnologisch hergestellten cDNA (z. B. von Britisch Bio-Technology Ltd., Oxford, England) gewonnen werden. Das DNA-Fragment wird unter Zusatz von synthetischen Oligonucleotiden, z.B. 5'-CATGCACAAGT GCGAT und 5'-ATCGCACTTGTG, welche die ersten 4 Aminosäure-Kodons von Interleukin-4 und zusätzlich das Kodon für das Start-Methionin enthalten, zwischen einen Expressionsvektor integriert, beispielsweise zwischen die NcoI- und BamHI-Schnittstellen des Expressionsvektors RT's pRC 109 (12).

Die site-directed-mutagenesis kann gemäß Kramer et al. durchgeführt werden (Nucleic Acids Research (1984) 12, 9441-9455; Cell (1984) 38, 879-887; und Boehringer-Mannheim-Prospekt, Biochemicals for Molecular Biology (1987) 35 etc., siehe auch (12)). Das zur Mutagenese verwendete Oligonucleotid kann etwa 6 bis 10 Basen vor und etwa 6 bis 10 Basen hinter der (den) zu ändernden Base(n) enthalten.

Der Fachmann ist auch mit dem Herausschneiden des den mutierten maturen Bereich von hIL-4 kodierenden DNA-Bereichs aus dem Vektor, dem Überführen in einen Expressionsvektor, dem Einsetzen in E. coli sowie dem Exprimieren des hIL-4-Mutantenproteins und ihrer fakultativen Isolierung vertraut (McCarthy et al.; Gene (1986) 41, 201-206; Kato et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun (1985) 130, 692-699), wobei Modifikationen (12) möglich sind.

Gemäß einer speziellen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens baut man in die cDNA, die den DNA-Bereich umfaßt, der

den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, DNA für in Initiator-Methionin ein, bevor man die gezielte Oligonucleotidmutagenese durchführt.

Gemäß einer weiteren speziellen Ausführungsform kann man den DNA-Bereich, der den mutierten maturen Bereich von hIL-4 kodiert, aus der cDNA-Mutante als NcoI/BamHI-Fragment heraus-schneiden.

Vorzugsweise verwendet man für die Expression einen temperatur-regulierten Expressionsvektor, beispielsweise pILA502 (ohne linksständigen Lambda-Promotor und Polylinker) und/oder einen gängigen E. coli-Stamm als Host, beispielsweise JM103 (recA⁻). Für pILA502 vergleiche man Schauder et al. (Gene (1987) 52, 279-283). Weitere geeignete Expressionsverfahren lassen sich von Pharmacia beziehen ("Prokaryotic Gene Fusion Vektors"). Der E. coli Stamm JM103 lässt sich gleichfalls von Pharmacia beziehen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine hIL-4-Mutante des Wildtyps, bei der im Bereich der Position 124 Tyr gegen Asp ausgetauscht ist.

Nachstehend wird die Erfindung durch zwei Beispiele näher erläu-tert.

Beispiel 1

Es wurde cDNA, die den maturen Bereich von hIL-4 und ein Initiator-Methionin kodierte, einer gezielten Oligonucleotid-Mutagenese gemäß Kramer et al. unterworfen. Das synthetische Oligo-nucleotid umfaßte 6 Basen vor und nach dem auszutauschenden Nucleotid und war mit Hilfe einer DNA-Synthese-Maschine herge-stellt worden (Applied Biosystems, Modell 380). Die auszutau-schend Stelle war Position 124 im C-terminal n, wahrscheinlich a-helicalen B reich (Positionen 110 bis 129). Dab i wurde Tyr g gen Gly ausgetauscht. Die erhaltene Mutation wurde durch DNA-

Sequenzanalys inzelsträngig r Bakt riophagen-DNA verifizi rt. Die mutierte cDNA wurde als NcoI/BamHI-Fragment aus der doppelsträngigen viralen DNA herausgeschnitten und mit einem temperaturregulierten Expressionsvektor kombiniert, der pILA502 mit der Ausnahme entsprach, daß der linksständige lambda-Promotor und der Polylinker fehlten. Als Host wurde ein recA- Derivat des E. coli-Stammes JM103 verwendet. Die integrierte hIL-4-cDNA wurde sequenziert, um die Mutation zu bestätigen. Danach wurde der Stamm für die Expression des Muteins eingesetzt.

Nach Expression und Isolierung zeigte sich, daß das Mutein (Y124G) mit unveränderter Affinität an den Rezeptor für hIL-4 bindet. Die maximal induzierbare Proliferation von aktivierten peripheren T-Zellen beträgt jedoch nur 10 - 20 % der durch hIL-4-Wildtyp induzierbaren Proliferation. Dies zeigt, daß Mutein Y124G die Eigenschaften eines partiellen Agonisten besitzt.

Beispiel 2

Es wurde Beispiel 1 mit der Ausnahme wiederholt, daß bei der Position 124 Asp statt Tyr exprimiert wurde. Das isolierte Mutein Y124D zeigt sogar bei einer 1 μ M Konzentration keine Aktivität gegen aktivierte periphere T-Zellen. Es hemmt jedoch die Aktivität des hIL-4-Wildtyps mit einer Hemmkonstante von etwa 600 pM. Dies zeigt, daß Mutein Y124D die Eigenschaften eines Antagonisten hat. Mutein Y124D hat eine kleine Restaktivität bei der Induktion von CD23 auf aktivierte B-Zellen. Die maximal erreichbare Induktion beträgt jedoch nur ca. 5 % der durch hIL-4-Wildtyp erreichbaren Induktion. Die Aktivität des hIL-4-Wildtyp wird in diesem System durch Mutein Y124D mit einer Hemmkonstante K_i von etwa 800 pM gehemmt. Mutein Y124D hat in dem B-Zell-System also die Eigenschaften eines sehr schwachen Agonisten.

Beispiel 1.3

Es wurde Beispiel 1 mit der Ausnahme wiederholt, daß bei der Position 121 Asp statt Arg exprimiert wurde. Das isolierte Mutein zeigte eine unveränderte Bindung an den hIL-4 Rezeptor. Die maximal induzierbare Proliferation von aktivierten peripheren T-Zellen betrug jedoch nur etwa 30 % der durch hIL-4-Wildtyp induzierbaren Proliferation. Dies zeigt, daß Mutein R 121 D die Eigenschaften eines partiellen Agonisten besitzt.

Beispiel 1.4

Es wurde Beispiel 1 mit der Ausnahme wiederholte, daß bei der Position 125 Asp statt Ser exprimiert wurde. Das isolierte Mutein S 125 D band mit unveränderter Affinität an den Rezeptor für hIL-4. Die maximal induzierbare Proliferation von aktivierten peripheren T-Zellen beträgt jedoch nur etwa 35 % der durch hIL-4-Wildtyp induzierbaren Proliferation.

- 8 -

Literaturverzeichnis:

- 1) Arai, K.I., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. and Yokota, T. (1990) Annu. Rev. Biochem. 59, 783-836.
- 2) Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban, J.F., Beckmann, M.P., Park, L.S., Schooley, K.A., Coffman, R.L., Mosmann, T.R. and Paul, W.E. (1990) Annu. Rev. Immunol. 8, 303-333.
- 3) Yokota, T., Arai, N., De Vries, J., Spits, H., Banchereau, J., Zlotnik, A., Rennick, D., Howard, M., Takebe, Y., Miyatake, S., Lee, F. and Arai, K.I. (1988) Immunol. Rev. 102, 137-187.
- 4) Idzerda, R.L., March, C.J., Mosley, B., Lyman, S.D., Vanden Bos, T., Gimpel, S.D., Din, W.S., Grabstein, K.H., Widmer, M.B., Park, L.S., Cosman, D. and Beckmann, M.P. (1990) J. Exp. Med. 171, 861-873.
- 5) Cosman, D., Lyman, S.D., Idzerda, R.L., Beckmann, M.P., Park, L.S., Goodwin, R.G. and March, C.J. (1990) Trends Biochem. Sci. 15, 265-270.
- 6) Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., DeFrance, T., Blanchard, D., De Vries, J.E., Lee, F. and Arai, K.I. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5894-5898.
- 7) Van Kimmenade, A., Bond, M.W., Schumacher, J.H., Laquai, C. and Kastelein, R.A. (1988) Eur. J. Biochem. 173, 109-114.
- 8) Jayaram, B., Bevos, R., Guisez, Y. and Fiers, W. (1989) Gene 79, 345-354.
- 9) Solari, R., Quint, D., Obray, H., McNamee, A., Bolton, E., Hissey, P., Champion, B., Zanders, E., Chaplin, A., Coomber, B., Watson, M., Roberts, B. and Weir, M. (1989) Biochem. J. 262, 897-908.
- 10) Coffman, R.L.; de Vries, J.E. (Schering Biotech Corp., USA), EP 327283 A1.
- 11) Abrams, J.S.; Chretien, I.; Lee, F.D.; Parce, M.K. (Schering Biotech Corp., USA) EP 314402 A2.
- 12) Weigl, U., Meyer, M. und Sebald, W. (1989) Eur. J. Biochem. 180, 295-300.

P A T E N T A N S P R O C H E

1. Therapeutische Mittel, die Antagonisten oder partielle Agonisten des hIL-4 sind oder diese enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die Antagonisten oder partiellen Agonisten hIL-4-Mutantenproteine sind.
2. Therapeutische Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in den hIL-4-Mutantenproteinen an einer oder mehreren der Positionen 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127 oder 128 die dort natürlicherweise im Wildtyp auftretende(n) Aminosäure(n) gegen eine bzw. mehrere andere der möglichen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht ist oder die Polypeptidkette abbricht.
3. Therapeutische Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß in den hIL-4-Mutantenproteinen an Position 124 die dort natürlicherweise auftretende Aminosäure Tyrosin gegen eine andere der möglichen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht ist.
4. Therapeutische Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß an Position 124 Tyrosin gegen Asparaginsäure oder gegen Glycin ausgetauscht ist.
5. hIL-4-Mutantenproteine, dadurch gekennzeichnet, daß an einer oder mehreren der Positionen 120, 121, 122, 123, 125, 126, 127 oder 128 und fakultativ zusätzlich an Position 124 die dort natürlicherweise auftretende(n) Aminosäure(n) gegen eine andere der möglichen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht ist oder die Polypeptidkette abbricht.
6. hIL-4-Mutantenproteine, dadurch gekennzeichnet, daß an Position 124 die dort natürliche rweise auftretend Aminosäure Tyrosin gegen eine andere der möglichen natürlichen Aminosäuren, mit Ausnahm von Asparaginsäure, ausgetauscht ist.

7. hIL-4-Mutantenprotein nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß Tyrosin gegen Glycin ausgetauscht ist.

8. Verfahren zum Herstellen von hIL-4-Mutantenproteinen nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man

- cDNA, die einen DNA-Bereich umfaßt, der den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, einer gezielten Oligonucleotid-Mutagenese (site-directed-mutagenesis) derart unterwirft, daß an der oder den gewünschten Position(en) eine ausgewählte andere der möglichen natürlichen Aminosäuren exprimiert wird,
- den DNA-Bereich, der den mutierten maturen Bereich von hIL-4 kodiert, in einen Expressionsvektor einsetzt,
- den gebildeten Hybrid-Vektor in *E. coli*, Hefe oder einer anderen Eucaryontenzelle einführt und
- die hIL-4-Mutantenproteine exprimiert und gegebenenfalls isoliert.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man in die cDNA, die den DNA-Bereich umfaßt, der den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, DNA für ein Initiator-Methionin einbaut, bevor man die gezielte Oligonucleotid-Mutagenese durchführt.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man den DNA-Bereich, der den mutierten maturen Bereich von hIL-4 kodiert, aus dem Vektor als NcoI/BamHI-Fragment heraus schneidet.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man einen temperatur-regulierten Expressionsvektor, beispielsweise pILA 502 (ohne linksständigen Lambda-Promotor und Polylinker) und/oder den modifizierten *E. coli* Stamm JM103 (recA-) als Host verwendet.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.5 C12N15/24; A61K37/02; C07K13/00; C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.5 C07K; C12N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FEBS LETTERS. Vol. 286, No. 1,2, July 1991, AMSTERDAM NL pages 58 - 60 NIELS KRUSE ET AL "Site-directed mutagenesis reveals the importance of disulfide bridges and aromatic residues for structure and proliferative activity of human Interleukin-4" see the whole document ---	5-6,8-11
P,X	EMBO JOURNAL. Vol. 11, No. 9, September 1992, EYNSHAM, OXFORD GB pages 3237 - 3244 N. KRUSE ET AL "Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement" see the whole document ---	1-4,6-11 -/-

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 February 1993 (03.02.93)Date of mailing of the international search report
23 February 1993 (23.02.93)Name and mailing address of the ISA/
EUROPEAN PATENT OFFICE
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 92/02614

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY Vol. 180, 1989, BERLIN pages 295 - 300 U. WEIGEL ET AL "Mutant proteins of human interleukin 2. Renaturation yield, proliferative activity and receptor binding" cited in the application see page 296, left-hand column ----	8-11
P,X	BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER Vol. 373, No. 9, September 1992, pages 789 - 790 N. KRUSE ET AL "Mutational analysis of human Interleukin-4 : Identification of crucial amino acids for receptor binding and generation of a high affinity antagonist" see abstract -----	5-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 92/02614

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben)⁶

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 C12N15/24; A61K37/02; C07K13/00; C12P21/02

II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete

Recherchierter Mindestprästoff⁷

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C07K ;	C12N ; A61K

Recherchierte nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹

Art. ¹⁰	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	<p>FEBS LETTERS. Bd. 286, Nr. 1,2, Juli 1991, AMSTERDAM NL Seiten 58 - 60 NIELS KRUSE ET AL 'Site-directed mutagenesis reveals the importance of disulfide bridges and aromatic residues for structure and proliferative activity of human Interleukin-4' siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	5-6,8-11

⁶ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zur Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- "A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

03. FEBRUAR 1993

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23. 02. 93

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevoilichtigten Bediensteten

LE CORNEC N.D.R.

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art°	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>EMBO JOURNAL. Bd. 11, Nr. 9, September 1992, EYNSHAM, OXFORD GB Seiten 3237 - 3244 N. KRUSE ET AL 'Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement' siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-4,6-11
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY Bd. 180, 1989, BERLIN Seiten 295 - 300 U. WEIGEL ET AL 'Mutant proteins of human interleukin 2 . Renaturation yield,proliferative activity and receptor binding' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 296, linke Spalte</p> <p>-----</p>	8-11
P,X	<p>BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER Bd. 373, Nr. 9, September 1992, Seiten 789 - 790 N. KRUSE ET AL 'Mutational analysis of human Interleukin-4 : Identification of crucial amino acids for receptor binding and generation of a high affinity antagonist' siehe Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	5-11

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 15/24, A61K 37/02 C07K 13/00, C12P 21/02</p>		A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/10235 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Mai 1993 (27.05.93)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02614 (22) Internationales Anmeldedatum: 13. November 1992 (13.11.92)</p>		<p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(30) Prioritätsdaten: P 41 37 333.2 13. November 1991 (13.11.91) DE</p>			
<p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: SEBALD, Walter [DE/DE]; Meyer-Olberslebenstr. 7, D-8700 Würzburg (DE).</p>			
<p>(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw. ; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).</p>			
<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CS, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).</p>			
<p>(54) Title: HUMAN IL-4 MUTANT PROTEINS</p>			
<p>(54) Bezeichnung: MENSCHLICHE IL-4 MUTANTENPROTEINE</p>			
<p>(57) Abstract</p>			
<p>Therapeutic agents constituted by or containing antagonists or partial antagonists of human interleukin-4, hIL-4 mutant proteins and a process for producing the same are disclosed.</p>			
<p>(57) Zusammenfassung</p>			
<p>Die Erfindung betrifft therapeutische Mittel, die Antagonisten oder partielle Antagonisten des humanen Interleukin 4 sind oder diese enthalten, hIL-4-Mutantenproteine sowie Verfahren zu deren Herstellung.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	L'	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	MC	Marokko	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam
FI	Finnland				

MENSCHLICHE IL-4 MUTANTENPROTEINE

Breite Bevölkerungsschichten leiden heute an Allergien. Die zunehmende Luftverschmutzung und die zunehmende Zahl an diffus in der Umwelt vorhandenen, allergieauslösenden Substanzen läßt erwarten, daß die Zahl der Erkrankungen, insbesondere bei Kindern, in Zukunft noch weiter steigen wird. Deshalb ist es dringend notwendig, Medikamente zu entwickeln, die in den Ablauf allergischer Prozesse eingreifen können.

Humanes Interleukin-4 (hIL-4) ist eines unter den zahlreichen Cytokinen, die die Proliferation, die Reifung, das Überleben und die Differenzierung lymphoider und myeloischer Zellen induzieren und koordinieren (1-3). Insbesondere ist hIL-4 an der IgE-medierten Immunreaktion beteiligt und beschleunigt direkt die Proliferation von Thymozyten und aktivierten T-Zellen. Man konnte ein hochaffines IL-4-Rezeptorprotein mit Mr 140 000 identifizieren, welches gemäß seiner cDNA-Sequenz aus 800 Aminosäureresten besteht (4). Dieses gehört zu einer kürzlich beschriebenen Gruppe von Rezeptoren, die man als Hämatopoietin-Rezeptor-Superfamilie bezeichnet (5).

Die Aminosäuresequenz des reifen IL-4 besteht aus 129 Resten, wenn man die klonierte cDNA (6) zugrundelegt. Die cDNA ist in E. coli (7, 8) und Hefe (9) exprimiert worden. Aus diesen Quellen kann rekombinantes IL-4 mit hoher biologischer Aktivität gewonnen werden.

Die Rolle des Interleukin 4 bei allergischen Prozessen läßt hoffen, daß Substanzen, die Interleukin-4-vermittelte Prozesse inhibieren oder mit dem hIL-4 konkurrieren, die krankheitsauslösende Reaktionskette unterbrechen.

Es ist deshalb Aufgabe der Erfindung, therapeutische Mittel zur Verfügung zu stellen, deren aktive Bestandteile Antagonisten oder partielle Agonisten des menschlichen Interleukins 4 sind.

In jüngster Zeit ist bereits ein monoklonaler Antikörper bekannt geworden, der gegenüber dem menschlichen Interleukin-4 antagonistische Eigenschaften aufweist (10). Dieser Antikörper enthält ein Fab-Fragment und wird von einer Mensch-Mensch-Hybridomazelllinie produziert. Auch eine Hybridomazelllinie aus Milzzellen einer gegen (nicht-)glycosyliertes menschliches IL-4 immunisierten Ratte produziert monoklonale Antikörpergen hIL-4 (11).

Die gestellte Aufgabe wurde vorliegend erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß therapeutische Mittel bereitgestellt werden, die Antagonisten oder partielle Agonisten des hIL-4 sind oder diese enthalten und dadurch gekennzeichnet sind, daß die Antagonisten oder partiellen Agonisten hIL-4-Mutantenproteine sind. Die Wahl der erfindungsgemäßen therapeutischen Mittel hat den Vorteil, daß durch "genetic engineering" gezielt Proteine hergestellt werden können, die durch ihre Ähnlichkeit mit dem Wildtyp hIL-4 mit diesem in Konkurrenz bei der Besetzung des hIL-4-Rezeptors treten.

Es ist weiterhin Aufgabe der Erfindung, hIL-4-Mutantenproteine sowie Verfahren zur deren Herstellung bereitzustellen.

hIL-4 läßt sich als rekombinates Protein (rhIL-4) gentechnologisch, z. B. in E. coli, erzeugen. Das dabei gebildete Protein läßt sich solubilisieren, renaturieren und isolieren. Das rhIL-4 besitzt dann eine hohe zytische biologisch Aktivität, die z. B. durch Messung der DNA-Synthese/Proliferation von aktivierten

T-Zell n oder der CD23 Expression von aktivierten B-Zellen bestimmt werden kann (siehe z. B. Kruse, N. et al. (1991) FEBS Lett. 286, 58-60; Kikutani, H. et al. (1986) Cell 47, 657-665).

Erfnungsgemäß wurde nun ein Verfahren konzipiert, mit dem sich Mutantenproteine des hIL-4-Wildtyps produzieren lassen, welche die Eigenschaften von hIL-4 Antagonisten oder partiellen hIL-4 Agonisten besitzen. Besonders die Antagonisten des hIL-4 bieten die Möglichkeit, spezifisch die Wirkung des hIL-4 zu hemmen. Dazu wird

- cDNA, die einen DNA-Bereich umfaßt, der den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, einer gezielten Oligonucleotid-Mutagenese (site-directed mutagenesis) derart unterworfen, daß an der oder den gewünschten Position(en) eine ausgewählte andere der möglichen natürlichen Aminosäuren exprimiert wird, oder durch ein Stop-Kodon ein Abbruch der Polypeptidkette erzeugt wird,
- der DNA-Bereich, der den mutierten maturen Bereich von hIL-4 kodiert, in einen Expressionsvektor integriert,
- der gebildete Hybrid-Vektor in E. coli eingesetzt und
- das hIL-4-Mutantenprotein exprimiert und gegebenenfalls isoliert.

Zur Beschaffung von cDNA, die einen DNA-Bereich umfaßt, der den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, oder die den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, wird auf (6) und die dort angeführte Literatur verwiesen. Im vorliegenden Zusammenhang werden unter "cDNA, die den maturen Bereich von hIL-4 kodiert" auch cDNAs verstanden, die bei etwa gleicher Anzahl von Basenpaaren Mutanten der konkret im genannten Stand der Technik angegebenen cDNA darstellen, sofern die damit vorzusehenden hIL-4-Mutante ebenfalls Antagonisten oder partielle Agonisten sind.

Hinsichtlich der Durchnumerierung des den maturen Bereich von hIL-4 kodierenden DNA-Bereichs wird hier Garr, C. et al. (Biochemistry (1991) 30, 1515-1523) gefolgt.

cDNA, die den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, kann durch das Ausschneiden eines EcoRV/BamHI-Fragment aus einer gentechnologisch hergestellten cDNA (z. B. von Britisch Bio-Technology Ltd., Oxford, England) gewonnen werden. Das DNA-Fragment wird unter Zusatz von synthetischen Oligonucleotiden, z.B. 5'-CATGCACAAAGTGCGAT und 5'-ATCGCACTTGTG, welche die ersten 4 Aminosäure-Kodons von Interleukin-4 und zusätzlich das Kodon für das Start-Methionin enthalten, zwischen einen Expressionsvektor integriert, beispielsweise zwischen die NcoI- und BamHI-Schnittstellen des Expressionsvektors RT's pRC 109 (12).

Die site-directed-mutagenesis kann gemäß Kramer et al. durchgeführt werden (Nucleic Acids Research (1984) 12, 9441-9455; Cell (1984) 38, 879-887; und Boehringer-Mannheim-Prospekt, Biochemicals for Molecular Biology (1987) 35 etc., siehe auch (12). Das zur Mutagenese verwendete Oligonucleotid kann etwa 6 bis 10 Basen vor und etwa 6 bis 10 Basen hinter der (den) zu ändernden Base(n) enthalten.

Der Fachmann ist auch mit dem Herausschneiden des den mutierten maturen Bereich von hIL-4 kodierenden DNA-Bereichs aus dem Vektor, dem Überführen in einen Expressionsvektor, dem Einsetzen in E. coli sowie dem Exprimieren des hIL-4-Mutantenproteins und ihrer fakultativen Isolierung vertraut (McCarthy et al.; Gene (1986) 41, 201-206; Kato et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun (1985) 130, 692-699), wobei Modifikationen (12) möglich sind.

Gemäß einer speziellen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens baut man in die cDNA, die den DNA-Bereich umfaßt, der

den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, DNA für in Initiator-Methionin ein, bevor man die gezielte Oligonucleotidmutagenese durchführt.

Gemäß einer weiteren speziellen Ausführungsform kann man den DNA-Bereich, der den mutierten maturen Bereich von hIL-4 kodiert, aus der cDNA-Mutante als NcoI/BamHI-Fragment herauschneiden.

Vorzugsweise verwendet man für die Expression einen temperaturregulierten Expressionsvektor, beispielsweise pILA502 (ohne linksständigen lambda-Promotor und Polylinker) und/oder einen gängigen E. coli-Stamm als Host, beispielsweise JM103 (*recA⁻*). Für pILA502 vergleiche man Schauder et al. (Gene (1987) 52, 279-283). Weitere geeignete Expressionsverfahren lassen sich von Pharmacia beziehen ("Prokaryotic Gene Fusion Vektors"). Der E. coli Stamm JM103 lässt sich gleichfalls von Pharmacia beziehen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine hIL-4-Mutante des Wildtyps, bei der im Bereich der Position 124 Tyr gegen Asp ausgetauscht ist.

Nachstehend wird die Erfindung durch zwei Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Es wurde cDNA, die den maturen Bereich von hIL-4 und ein Initiator-Methionin kodierte, einer gezielten Oligonucleotid-Mutagenese gemäß Kramer et al. unterworfen. Das synthetische Oligonucleotid umfaßte 6 Basen vor und nach dem auszutauschenden Nucleotid und war mit Hilfe einer DNA-Synthese-Maschine hergestellt worden (Applied Biosystems, Modell 380). Die auszutauschende Stelle war Position 124 im C-terminalen, wahrscheinlich α -helicalen Bereich (Positionen 110 bis 129). Dabei wurde Tyr gegen Gly ausgetauscht. Die erhaltene Mutation wurde durch DNA-

Sequenzanalyse inz 1strängiger Bakteriophagen-DNA v rifizi rt. Die mutiert cDNA wurd als NcoI/BamHI-Fragment aus d r dopp 1-strängigen viralen DNA herausgeschnitten und mit einem temperaturregulierten Expressionsvektor kombiniert, der pILA502 mit der Ausnahme entsprach, daß der linksständige lambda-Promotor und der Polylinker fehlten. Als Host wurde ein recA- Derivat des E. coli-Stammes JM103 verwendet. Die integrierte hIL-4-cDNA wurde sequenziert, um die Mutation zu bestätigen. Danach wurde der Stamm für die Expression des Muteins eingesetzt.

Nach Expression und Isolierung zeigte sich, daß das Mutein (Y124G) mit unveränderter Affinität an den Rezeptor für hIL-4 bindet. Die maximal induzierbare Proliferation von aktivierten peripheren T-Zellen beträgt jedoch nur 10 - 20 % der durch hIL-4-Wildtyp induzierbaren Proliferation. Dies zeigt, daß Mutein Y124G die Eigenschaften eines partiellen Agonisten besitzt.

Beispiel 2

Es wurde Beispiel 1 mit der Ausnahme wiederholt, daß bei der Position 124 Asp statt Tyr exprimiert wurde. Das isolierte Mutein Y124D zeigt sogar bei einer 1 μ M Konzentration keine Aktivität gegen aktivierte periphere T-Zellen. Es hemmt jedoch die Aktivität des hIL-4-Wildtyps mit einer Hemmkonstante von etwa 600 pM. Dies zeigt, daß Mutein Y124D die Eigenschaften eines Antagonisten hat. Mutein Y124D hat eine kleine Restaktivität bei der Induktion von CD23 auf aktivierte B-Zellen. Die maximal erreichbare Induktion beträgt jedoch nur ca. 5 % der durch hIL-4-Wildtyp erreichbaren Induktion. Die Aktivität des hIL-4-Wildtyp wird in diesem System durch Mutein Y124D mit einer Hemmkonstante K_i von etwa 800 pM gehemmt. Mutein Y124D hat in dem B-Zell-System also die Eigenschaften eines sehr schwachen Agonisten.

Beispiel 3

Es wurde Beispiel 1 mit der Ausnahme wiederholt, daß bei der Position 121 Asp statt Arg exprimiert wurde. Das isolierte Mutein zeigte eine unveränderte Bindung an den hIL-4 Rezeptor. Die maximal induzierbare Proliferation von aktivierten peripheren T-Zellen betrug jedoch nur etwa 30 % der durch hIL-4-Wildtyp induzierbaren Proliferation. Dies zeigt, daß Mutein R 121 D die Eigenschaften eines partiellen Agonisten besitzt.

Beispiel 4

Es wurde Beispiel 1 mit der Ausnahme wiederholte, daß bei der Position 125 Asp statt Ser exprimiert wurde. Das isolierte Mutein S 125 D band mit unveränderter Affinität an den Rezeptor für hIL-4. Die maximal induzierbare Proliferation von aktivierten peripheren T-Zellen beträgt jedoch nur etwa 35 % der durch hIL-4-Wildtyp induzierbaren Proliferation.

- 8 -

Literaturverzeichnis:

- 1) Arai, K.I., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. and Yokota, T. (1990) Annu. Rev. Biochem. 59, 783-836.
- 2) Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban, J.F., Beckmann, M.P., Park, L.S., Schooley, K.A., Coffman, R.L., Mosmann, T.R. and Paul, W.E. (1990) Annu. Rev. Immunol. 8, 303-333.
- 3) Yokota, T., Arai, N., De Vries, J., Spits, H., Banchereau, J., Zlotnik, A., Rennick, D., Howard, M., Takebe, Y., Miyatake, S., Lee, F. and Arai, K.I. (1988) Immunol. Rev. 102, 137-187.
- 4) Idzerda, R.L., March, C.J., Mosley, B., Lyman, S.D., Vanden Bos, T., Gimpel, S.D., Din, W.S., Grabstein, K.H., Widmer, M.B., Park, L.S., Cosman, D. and Beckmann, M.P. (1990) J. Exp. Med. 171, 861-873.
- 5) Cosman, D., Lyman, S.D., Idzerda, R.L., Beckmann, M.P., Park, L.S., Goodwin, R.G. and March, C.J. (1990) Trends Biochem. Sci. 15, 265-270.
- 6) Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., DeFrance, T., Blanchard, D., De Vries, J.E., Lee, F. and Arai, K.I. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5894-5898.
- 7) Van Kimmenade, A., Bond, M.W., Schumacher, J.H., Laquai, C. and Kastelein, R.A. (1988) Eur. J. Biochem. 173, 109-114.
- 8) Jayaram, B., Bevos, R., Guisez, Y. and Fiers, W. (1989) Gene 79, 345-354.
- 9) Solari, R., Quint, D., Obray, H., McNamee, A., Bolton, E., Hissey, P., Champion, B., Zanders, E., Chaplin, A., Coomber, B., Watson, M., Roberts, B. and Weir, M. (1989) Biochem. J. 262, 897-908.
- 10) Coffman, R.L.; de Vries, J.E. (Schering Biotech Corp., USA), EP 327283 A1.
- 11) Abrams, J.S.; Chretien, I.; Lee, F.D.; Pearce, M.K. (Schering Biotech Corp., USA) EP 314402 A2.
- 12) Wigl, U., Meyer, M. und Sebald, W. (1989) Eur. J. Biochem. 180, 295-300.

P A T E N T A N S P R O C H E

1. Therapeutische Mittel, die Antagonisten oder partielle Agonisten des hIL-4 sind oder diese enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die Antagonisten oder partiellen Agonisten hIL-4-Mutantenproteine sind.
2. Therapeutische Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in den hIL-4-Mutantenproteinen an einer oder mehreren der Positionen 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127 oder 128 die dort natürlicherweise im Wildtyp auftretende(n) Aminosäure(n) gegen eine bzw. mehrere andere der möglichen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht ist oder die Polypeptidkette abbricht.
3. Therapeutische Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß in den hIL-4-Mutantenproteinen an Position 124 die dort natürlicherweise auftretende Aminosäure Tyrosin gegen eine andere der möglichen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht ist.
4. Therapeutische Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß an Position 124 Tyrosin gegen Asparaginsäure oder gegen Glycin ausgetauscht ist.
5. hIL-4-Mutantenproteine, dadurch gekennzeichnet, daß an einer oder mehreren der Positionen 120, 121, 122, 123, 125, 126, 127 oder 128 und fakultativ zusätzlich an Position 124 die dort natürlicherweise auftretende(n) Aminosäure(n) gegen eine andere der möglichen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht ist oder die Polypeptidkette abbricht.
6. hIL-4-Mutantenproteine, dadurch gekennzeichnet, daß an Position 124 die dort natürlicherweise auftretende Aminosäure Tyrosin gegen eine andere der möglichen natürlichen Aminosäuren, mit Ausnahme von Asparaginsäure, ausgetauscht ist.

7. hIL-4-Mutantenprotein nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß Tyrosin gegen Glycin ausgetauscht ist.

8. Verfahren zum Herstellen von hIL-4-Mutantenproteinen nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man

- cDNA, die einen DNA-Bereich umfaßt, der den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, einer gezielten Oligonucleotid-Mutagenese (site-directed-mutagenesis) derart unterwirft, daß an der oder den gewünschten Position(en) eine ausgewählte andere der möglichen natürlichen Aminosäuren exprimiert wird,
- den DNA-Bereich, der den mutierten maturen Bereich von hIL-4 kodiert, in einen Expressionsvektor einsetzt,
- den gebildeten Hybrid-Vektor in *E. coli*, Hefe oder einer anderen Eucaryontenzelle einführt und
- die hIL-4-Mutantenproteine exprimiert und gegebenenfalls isoliert.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man in die cDNA, die den DNA-Bereich umfaßt, der den maturen Bereich von hIL-4 kodiert, DNA für ein Initiator-Methionin einbaut, bevor man die gezielte Oligonucleotid-Mutagenese durchführt.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man den DNA-Bereich, der den mutierten maturen Bereich von hIL-4 kodiert, aus dem Vektor als NcoI/BamHI-Fragment heraus schneidet.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man einen temperatur-regulierten Expressionsvektor, beispielsweise pILA 502 (ohne linksständigen Lambda-Promotor und Polylinker) und/oder den modifizierten *E. coli* Stamm JM103 (recA⁻) als Host verwendet.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP 92/02614
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.5 C12N15/24; A61K37/02; C07K13/00; C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.5 C07K; C12N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FEBS LETTERS. Vol. 286, No. 1,2, July 1991, AMSTERDAM NL pages 58 - 60 NIELS KRUSE ET AL "Site-directed mutagenesis reveals the importance of disulfide bridges and aromatic residues for structure and proliferative activity of human Interleukin-4" see the whole document ---	5-6,8-11
P,X	EMBO JOURNAL. Vol. 11, No. 9, September 1992, EYNSHAM, OXFORD GB pages 3237 - 3244 N. KRUSE ET AL "Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement" see the whole document ---	1-4,6-11 -/-

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 February 1993 (03.02.93)Date of mailing of the international search report
23 February 1993 (23.02.93)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 92/02614

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY Vol. 180, 1989, BERLIN pages 295 - 300 U. NEIGEL ET AL "Mutant proteins of human interleukin 2. Renaturation yield, proliferative activity and receptor binding" cited in the application see page 296, left-hand column</p> <p style="text-align: center;">---</p>	8-11
P,X	<p>BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER Vol. 373, No. 9, September 1992, pages 789 - 790 N. KRUSE ET AL "Mutational analysis of human Interleukin-4 : Identification of crucial amino acids for receptor binding and generation of a high affinity antagonist" see abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	5-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 92/02614

Internationales Aktenzeichen

I. KLASSEFAKTION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben)⁶

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.K1. 5 C12N15/24; A61K37/02; C07K13/00; C12P21/02

II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete

Recherchierter Mindestprästoff⁷

Klassifikationssystem	Klassifikationsymbole		
Int.K1. 5	C07K ;	C12N ;	A61K

Recherchierte nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹

Art. ¹⁰	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	<p>FEBS LETTERS.</p> <p>Bd. 286, Nr. 1,2, Juli 1991, AMSTERDAM NL</p> <p>Seiten 58 - 60</p> <p>NIELS KRUSE ET AL 'Site-directed mutagenesis reveals the importance of disulfide bridges and aromatic residues for structure and proliferative activity of human Interleukin-4'</p> <p>siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	5-6,8-11

⁶ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam einzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum eines anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie zugeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mindliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 03. FEBRUAR 1993	Absendedatum des internationalen Rechercheberichts 23.02.93
Internationale Recherchebehörde EUROPAISCHES PATENTAMT	Unterschrift des bevoilichtigten Bediensteten LE CORNEC N.D.R.

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	EMBO JOURNAL. Bd. 11, Nr. 9, September 1992, EYNSHAM, OXFORD GB Seiten 3237 - 3244 N. KRUSE ET AL 'Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement' siehe das ganze Dokument ---	1-4, 6-11
A	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY Bd. 180, 1989, BERLIN Seiten 295 - 300 U. WEIGEL ET AL 'Mutant proteins of human interleukin 2 . Renaturation yield,proliferative activity and receptor binding' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 296, linke Spalte ---	8-11
P,X	BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER Bd. 373, Nr. 9, September 1992, Seiten 789 - 790 N. KRUSE ET AL 'Mutational analysis of human Interleukin-4 : Identification of crucial amino acids for receptor binding and generation of a high affinity antagonist' siehe Zusammenfassung -----	5-11